

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-000299

(43)Date of publication of application : 09.01.1996

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68  
C12N 15/00  
// C12Q 1/70

(21)Application number : 06-136189

(71)Applicant : EIKEN CHEM CO LTD  
TANABE SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 17.06.1994

(72)Inventor : HASE SATORU  
MASUBUCHI HARUMI

(54) PROMOTION OF HYBRIDIZATION OF COMPLEMENTARY CHAIN NUCLEIC ACID TO TARGET NUCLEIC ACID AND DETECTION OF NUCLEIC ACID BY THE SAME METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable hybridization of a small-size oligonucleotide difficult to hybridize, speed-up of the prove method and improvement of the sensitivity and prevent a bad influence caused by contamination.

CONSTITUTION: In a process for hybridizing the second probe having a sequence complementary to the target nucleic acid, this method for promotion of hybridization of the secondary prove is carried out by hybridizing it together with the primary prove having a sequence adjacent to the 3' side of the secondary prove and containing a sufficient number of bases capable of forming a stable double stranded chain with the target nucleic acid by itself and/or the primary probe having a sequence adjacent to the 5' side of the secondary probe and containing a sufficient number of bases capable of forming a stable double stranded chain with the target nucleic acid by itself. A method for detection of a nucleic acid by using this promotion method and a reagent used for this detection are also provided.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

16.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C), 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-299

(43)公開日 平成8年(1996)1月9日

(51)IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12Q 1/68	ZNA A	9453-4B		
C12N 15/00				
// C12Q 1/70		9453-4B		
		9281-4B	C12N 15/00	
審査請求 未請求 請求項の数26 OL (全 18 頁)				

(21)出願番号 特願平6-136189  
 (22)出願日 平成6年(1994)6月17日

(71)出願人 000120456  
 栄研化学株式会社  
 東京都文京区本郷1丁目33番8号  
 (71)出願人 000002956  
 田辺製薬株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号  
 (72)発明者 長谷 哲  
 栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学  
 株式会社免疫化学研究所内  
 (72)発明者 増淵 晴美  
 栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学  
 株式会社免疫化学研究所内  
 (74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 標的核酸に対する相補鎖核酸のハイブリダイゼーションの促進法及びこれを用いた核酸の検出法

(57)【要約】

【構成】 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせる工程において、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブとともにハイブリダイズさせることを特徴とする第2プローブのハイブリダイズ促進法、これを用いた核酸の検出法、並びに該検出法に用いる試薬。

【効果】 ハイブリダイズしにくい小さなサイズのオリゴヌクレオチドもハイブリダイズできる。プローブ法の迅速化、高感度化が可能になり、またコンタミネーションの影響を受けにくくなる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせる工程において、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブとともにハイブリダイズさせることを特徴とする第2プローブのハイブリダイズ促進法。

【請求項2】 第1プローブとして標的核酸中において離れた位置に存在する2つの配列に相当する配列を備えた2種のオリゴヌクレオチドを用い、第2プローブとして前記2種の第1プローブの間に位置し、かつ該第2プローブの末端がそれぞれの第1プローブの末端に隣接する配列を備えたオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項1記載の促進法。

【請求項3】 第2プローブが、単独では標的核酸と安定なハイブリダイズを形成できないものであることを特徴とする請求項1記載の促進法。

【請求項4】 第1プローブの塩基数が、10以上である請求項1記載の促進法。

【請求項5】 以下の工程：

(A) 検出対象の標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブをハイブリダイズさせて2本鎖核酸を形成させる工程、(B) 工程(A)で形成される2本鎖核酸の2本鎖領域の3'側及び/又は5'側に隣接するように、該標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせて2本鎖核酸を形成させる工程、及び(C) 工程(B)でハイブリダイズしたプローブを検出する工程を含むことを特徴とする核酸の検出法。

【請求項6】 第1プローブとして標的核酸中において離れた位置に存在する2つの配列に相当する配列を備えた2種のオリゴヌクレオチドを用い、第2プローブとして前記2種の第1プローブの間に位置し、かつ該第2プローブの末端がそれぞれの第1プローブの末端に隣接する配列を備えたオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項7】 第2プローブが、単独では標的核酸と安定なハイブリダイズを形成できないものであることを特徴とする請求項5記載の記載の検出法。

【請求項8】 標的核酸を含む検体と第1プローブ及び第2プローブとを混合して、工程(A)と工程(B)を並行して行うことを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項9】 標的核酸を含む検体と第1プローブを混合して工程(A)を行った後、工程(B)を一定温度で行うことを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項10】 工程(B)で形成された2本鎖核酸を特異的に認識し分解する酵素を作用させて第2プローブ

を分解させる工程(B')を行い、工程(B)及び工程(B')を繰り返すことによって蓄積されるプローブ核酸の分解産物を検出することを特徴とする請求項9記載の検出法。

【請求項11】 第1プローブが工程(B')で使用する分解酵素に耐性であることを特徴とする請求項10記載の検出法。

【請求項12】 工程(B')で使用する酵素が2本鎖核酸に特異的でDNAの3'末端から分解するエクソヌクレアーゼIIIであることを特徴とする請求項10記載の検出法。

【請求項13】 第1プローブの5'末端と第2プローブの3'末端が隣合う配列からなる請求項12記載の検出法。

【請求項14】 第2プローブの5'末端がリン酸化されており、工程(B')で使用する酵素が2本鎖核酸に特異的でDNAの5'末端から分解するλエクソヌクレアーゼであることを特徴とする請求項10記載の検出法。

【請求項15】 第1プローブの3'末端と第2プローブの5'末端が隣合う配列からなる請求項14記載の検出法。

【請求項16】 標的核酸がDNAであり、工程(B)で使用する第2プローブがRNA又はRNAを一部に含むものであり、工程(B')で使用する酵素がDNA-RNAハイブリッドのRNA部分を特異的に分解するリボヌクレアーゼHであることを特徴とする請求項10記載の検出法。

【請求項17】 工程(B)で形成された2本鎖核酸に核酸合成酵素を作用させて第2プローブを延長させる工程(B'')を行い、この産物を検出することを特徴とする請求項8又は9記載の検出法。

【請求項18】 標的核酸がDNAであり、工程(B'')で使用する酵素がDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項17記載の検出法。

【請求項19】 標的核酸がRNAであり、工程(B'')で使用する酵素が逆転写酵素であることを特徴とする請求項17記載の検出法。

【請求項20】 第1プローブが工程(B'')で使用する合成酵素のヌクレアーゼ活性に耐性であることを特徴とする請求項17記載の検出法。

【請求項21】 第1プローブが工程(B'')で使用する合成酵素のプライマーにはならないことを特徴とする請求項17記載の検出法。

【請求項22】 第1プローブ及び第2プローブを予想される標的核酸の量に対して等量以上用いることを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項23】 第2プローブを予想される標的核酸の量に対して大過剰量用いることを特徴とする請求項22記載の検出法。

【請求項24】 第2プローブが放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、ビオチン、酵素又はハプテンで標識されていることを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項25】 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブ、並びに、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブを含むことを特徴とする核酸検出用試薬。

【請求項26】 以下の成分：

(i) 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブ、(i) 該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ、並びに、(iii) 標的核酸とハイブリダイズした該第2プローブを特異的に認識し分解する酵素又は標的核酸とハイブリダイズした該第2プローブを特異的に認識し延長させる核酸合成酵素を含むことを特徴とする核酸検出用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、試料中に存在する特定の塩基配列を含む核酸（以下「標的核酸」という。）に対する相補鎖核酸のハイブリダイゼーションの促進法及びこれを用いた核酸の検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸塩基配列の相補性に基づくプローブ法は、遺伝的な特徴を直接的に分析することができるため、遺伝的疾患、癌化、微生物の識別等に有力な手段となっている。このプローブ法は核酸同士の水素結合による2本鎖形成（ハイブリダイゼーション）能を利用した技術である。即ち、DNA分子は塩基間の水素結合で結ばれた二重らせん構造を有するが、これを水溶液中で加熱していくと、ある温度で塩基間水素結合が切れて1本ずつのポリヌクレオチド鎖に分かれる。この現象を変性と呼び、また変性の開始温度と終了温度の中間点を融解温度（ $T_m$ ＝Melting Temperature）と呼んでいる。この $T_m$ は2本鎖間の水素結合に依存するので、2本鎖部分のサイズ及びG（グアニン）－C（シトシン）含量に依存する。また、溶媒の媒質にも依存し、塩濃度が高いと $T_m$ が高くなる傾向がある。この変性したDNA溶液の温度をゆっくり下げて $T_m$ より少し低めの温度に保つと、一本鎖のDNAは再結合して二重らせん構造を形成する。この過程をアニーリング又はハイブリダイゼーションという。DNAプローブ法はこの核酸のアニーリング／ハイブリダイゼーションを利用したものである。即

ち、検体中に目的の遺伝子が存在するか否かを見るために、検体より抽出した核酸（DNA又はRNA）と標識したプローブDNAとを混合し、特異的にハイブリダイズした標識体の量を測定することにより目的の遺伝子を検出することが行われている。

【0003】DNA等の核酸の検出技術において、現状では次のような課題が指摘されている。即ち、第1にハイブリダイゼーション効率とバックグラウンドの問題である。このオリゴヌクレオチドと標的DNAとのハイブリダイゼーションを利用した技術は、プローブ法に留まらず核酸同士の分子認識を利用した非常に広い領域で利用される基本技術となっている。しかし、ハイブリダイゼーション反応には、温度を上げて2本鎖を変性させる操作とそれに続いて温度を除々に下げてアニーリングさせる操作が必要であるため温度調節操作が必要で、精度を高くするには高度の技術と設備が要求される。

【0004】短いオリゴヌクレオチドを用いた場合は変性に際しての $T_m$ を低くでき、更にホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の変性剤を添加することにより低い温度でのハイブリダイゼーションが可能となる。しかし、室温でのハイブリダイズは核酸同士の結合速度が遅いため時間がかかること、非特異的なハイブリダイズが起こり易くなる等の問題点がある。

【0005】ハイブリダイゼーションを用いた方法では、一般にプローブ核酸を標的核酸に比べて大過剰量使用する。そのため、プローブの分子内又は分子間の非特異的なハイブリダイズが起こり易くなりバックグラウンドが高くなる要素となっていた。これを解決する方法の一つにプローブのサイズを短くすることが挙げられる。しかし、サイズを短くすることによりハイブリダイゼーションそのものの効率も低下するという問題点があった。

【0006】第2に、遺伝子量の増幅技術に関する課題がある。プローブDNAを用いた遺伝子診断法は遺伝的疾患や感染症の診断に非常に有効な技術であるが、検体中に目的の遺伝子量が少ない場合は、検出は容易ではなかった。これを克服するため、標的遺伝子そのもの又は検出シグナルを増幅する技術が開発されている。そのような標的遺伝子を増幅する方法の一つにPCR（Polymerase Chain Reaction）法が知られている。PCR法はDNA鎖の特定部位のみを繰り返し複製する反応であり、複製連鎖反応ともいわれるものである。複製反応のプライマーとしては増幅部両端の塩基配列を含む合成オリゴヌクレオチドを用いる。反応は1）DNA鎖の変性、2）オリゴヌクレオチドとのアニーリング、3）耐熱性のDNAポリメラーゼによる相補鎖合成、の3反応の繰り返し（通常20～30回）からなる。この結果、微量のDNAを $10^6$ 倍程度にまで増幅できるものである。

【0007】このPCR法はin vitroにおける核酸の増幅技術として最も一般的な方法であるが、反応に特別な

温度調節装置が必要なこと、増幅反応が対数的に進むことから定量性がないこと、増幅した産物によるコンタミネーションが起り易いこと等の問題点がある。コンタミネーションとは以前の反応で生じた増幅産物が次の反応液に誤って混入することをいい、PCR法のようにDNAを数百万倍にまで増幅させる反応では混入した微量DNAも同様に増幅されるため誤った結果を与える。これは特に多数の検体を同時に扱う場合には重大な問題となる。このコンタミネーションを防ぐため特別な密封容器内で反応させること(特開平6-27119号公報)や、DNA合成基質としてデオキシウラシル三リン酸を用いたPCR反応の産物をウラシルグリコシラーゼ処理する方法(特表平6-501612号公報)も考案されている。しかし、これらの方法も必ずしも有効とはいえない場合が多い。

【0008】第3に、検出信号の増幅技術においても課題が残されている。前述したようにPCR法を代表とした標的遺伝子を増幅する反応ではコンタミネーションの問題が付きまとうが、この問題がない検出シグナルを増幅する技術もある。本発明者らは、ハイブリダイズしたプローブDNAのみを分解し、かつ塩基配列によって限定されないエクソヌクレアーゼIIIを利用したシグナル増幅法について検討を行ってきた。この方法は、オリゴヌクレオチドプローブが相補的な配列とハイブリダイズして形成された2本鎖DNAにエクソヌクレアーゼIIIを作用させ、プローブDNAが2本鎖を維持できない程度まで分解されると新たなプローブDNAと置き替わり、続いてこの新たなプローブも分解されることによりサイクリング反応が起こるというものである。

【0009】しかし、サイクル反応を行うためにはプローブを標的核酸に繰り返しハイブリダイズさせることが必要であるが、これが反応全体の律速となるためサイクル数が必ずしも十分に起こらないという問題点があった。本発明者らは、このハイブリダイズを繰り返し反応の条件について研究を進め、ジメチルスルホキシド、エチレングリコール又はプロピレングリコールの存在下でこの繰り返し反応の効率上がることを見出し、既に特許出願を行った(特願平5-142745号)。

【0010】これ以外にも、プローブの分解と新たなプローブが標的部位に結合する反応を繰り返し起こさせることを利用したシグナル増幅法がいくつか開発されている。例えば、2本鎖DNAを特異的に切断する酵素にλエクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法がある(BioTechniques, Vol. 13, No. 6, 882-892 (1992))。しかしこの方法では、λエクソヌクレアーゼが基質として5'末端がリン酸化されたプローブDNAを要求するので、プローブDNAの5'末端をリン酸化しておく必要がある。

【0011】また、プローブとしてRNAを利用し、DNA-RNAハイブリッドのRNAのみを切断するリボ

ヌクレアーゼHを利用した方法も開発されている(BioTechniques, Vol. 9, No. 2, 142-147 (1990))。しかし、RNAは分解されやすくプローブを作製することが難しい等の難点がある。ハイブリダイズしたプローブDNAを制限酵素処理し、切断されたプローブ断片を検出する方法も開発されている(EP-0455517/A1)。しかし、プローブDNA以外に反応が繰り返し起こるようになるための特異的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドを共存させる必要がある、検出する部位に制限酵素切断部位が必要であるために検出部位が制限される等の欠点がある。

【0012】これらのシグナルを増幅する方法は、コンタミネーションの問題がなく、定量性もあり、特別な装置を必要としない等の利点があるので標的遺伝子の検出手段として有用な系となると期待できる。しかし、サイクル反応を行うためにはプローブを標的核酸に繰り返しハイブリダイズさせることが必要であるが、これが反応全体の律速となっており高感度化の妨げとなっていた。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】以上述べたようにプローブ法及び核酸増幅法はすべて標的核酸とプローブ又はプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが基本となっている。従って、特異的かつ高感度なプローブ法を開発するには、非特異的な反応を防ぎながら高頻度でハイブリダイズさせることが必要である。特に酵素を用いてシグナルを増幅する方法では、酵素が高度な耐熱性を備えていない限り特定の温度条件のもとでプローブを標的核酸に高頻度でハイブリダイズさせることが必要である。高温では反応に関与する酵素の活性を維持できないためである。

【0014】本発明の第1の目的は、標的核酸に対する相補鎖核酸のハイブリダイゼーションを促進する方法を提供することにある。本発明の第2の目的は、前記促進法を利用することによりプローブ法の迅速化、高感度化を可能にした核酸の検出法を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】2つのオリゴヌクレオチドが隣り合わせてギャップやミスマッチを作らずに当該ヌクレオチドの相補鎖核酸とハイブリダイズしている場合には、それぞれが形成するハイブリッドは相互に安定化されて変性しにくくなることが報告されている(CSH(Continuous Stacking Hybridization): FEBS LETTERS, Vol. 256, 118-122 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 3072-3076 (1994))。

【0016】一方、本発明者らは、標的核酸上で互いに隣接した位置にハイブリダイズするように設定された2つのオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイゼーションを行う場合、両者が隣接していない場合と比べてハイブリダイゼーション効率が向上することを見出した。

【0017】更に本発明者らは、この現象に着目し酵素

反応を利用したシグナル増幅法への応用についても検討を行った。即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせる工程において、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブとともにハイブリダイズさせることを特徴とする第2プローブのハイブリダイズ促進法。

(2) 第1プローブとして標的核酸中において離れた位置に存在する2つの配列に相当する配列を備えた2種のオリゴヌクレオチドを用い、第2プローブとして前記2種の第1プローブの間に位置し、かつ該第2プローブの末端がそれぞれの第1プローブの末端に隣接する配列を備えたオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする前記(1)に記載の促進法。

(3) 第2プローブが、単独では標的核酸と安定なハイブリダイズを形成できないものであることを特徴とする前記(1)に記載の促進法。

(4) 第1プローブの塩基数が、10以上である前記(1)に記載の促進法。

(5) 以下の工程：

(A) 検出対象の標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブをハイブリダイズさせて2本鎖核酸を形成させる工程、(B)工程(A)で形成される2本鎖核酸の2本鎖領域の3'側及び/又は5'側に隣接するように、該標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせて2本鎖核酸を形成させる工程、及び(C)工程(B)でハイブリダイズしたプローブを検出する工程を含むことを特徴とする核酸の検出法。

(6) 第1プローブとして標的核酸中において離れた位置に存在する2つの配列に相当する配列を備えた2種のオリゴヌクレオチドを用い、第2プローブとして前記2種の第1プローブの間に位置し、かつ該第2プローブの末端がそれぞれの第1プローブの末端に隣接する配列を備えたオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(7) 第2プローブが、単独では標的核酸と安定なハイブリダイズを形成できないものであることを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(8) 標的核酸を含む検体と第1プローブ及び第2プローブとを混合して、工程(A)と工程(B)を並行して行うことを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(9) 標的核酸を含む検体と第1プローブを混合して工程(A)を行った後、工程(B)を一定温度で行うことを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(10) 工程(B)で形成された2本鎖核酸を特異的に認

識し分解する酵素を作用させて第2プローブを分解させる工程(B')を行い、工程(B)及び工程(B')を繰り返すことによって蓄積されるプローブ核酸の分解産物を検出することを特徴とする前記(9)に記載の検出法。

(11) 第1プローブが工程(B')で使用する分解酵素に耐性であることを特徴とする前記(10)に記載の検出法。

(12) 工程(B')で使用する酵素が2本鎖核酸に特異的でDNAの3'末端から分解するエクソヌクレアーゼIIIであることを特徴とする前記(10)に記載の検出法。

(13) 第1プローブの5'末端と第2プローブの3'末端が隣合う配列からなる前記(12)に記載の検出法。

(14) 第2プローブの5'末端がリン酸化されており、工程(B')で使用する酵素が2本鎖核酸に特異的でDNAの5'末端から分解するλエクソヌクレアーゼであることを特徴とする前記(10)に記載の検出法。

(15) 第1プローブの3'末端と第2プローブの5'末端が隣合う配列からなる前記(14)に記載の検出法。

(16) 標的核酸がDNAであり、工程(B)で使用する第2プローブがRNA又はRNAを一部に含むものであり、工程(B')で使用する酵素がDNA-RNAハイブリッドのRNA部分を特異的に分解するリボヌクレアーゼHであることを特徴とする前記(10)に記載の検出法。

(17) 工程(B)で形成された2本鎖核酸に核酸合成酵素を作用させて第2プローブを延長させる工程(B'')を行い、この産物を検出することを特徴とする前記(8)又は(9)に記載の検出法。

(18) 標的核酸がDNAであり、工程(B'')で使用する酵素がDNAポリメラーゼであることを特徴とする前記(17)に記載の検出法。

(19) 標的核酸がRNAであり、工程(B'')で使用する酵素が逆転写酵素であることを特徴とする前記(17)に記載の検出法。

(20) 第1プローブが工程(B'')で使用する合成酵素のヌクレアーゼ活性に耐性であることを特徴とする前記(17)に記載の検出法。

(21) 第1プローブが工程(B'')で使用する合成酵素のプライマーにはならないことを特徴とする前記(17)に記載の検出法。

(22) 第1プローブ及び第2プローブを予想される標的核酸の量に対して等量以上用いることを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(23) 第2プローブを予想される標的核酸の量に対して大過剰量用いることを特徴とする前記(22)に記載の検出法。

(24) 第2プローブが放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、ビオチン、酵素又はハプテンで標識されているこ



とを特徴とする前記(5)に記載の検出法。

(25) 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブ、並びに、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブを含むことを特徴とする核酸検出用試薬。

(26) 以下の成分:

(i) 標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブ、(i) i) 該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ、並びに、(iii) 標的核酸とハイブリダイズした該第2プローブを特異的に認識し分解する酵素又は標的核酸とハイブリダイズした該第2プローブを特異的に認識し延長させる核酸合成酵素を含むことを特徴とする核酸検出用試薬。

【0018】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の相補鎖核酸のハイブリダイゼーションの促進法は、互いに相補的な配列を持つ2本の核酸をハイブリダイズさせる操作において広く応用することができる。特に有利な態様としては、先に述べたリボヌクレアーゼHによるシグナル増幅法(BioTechniques, Vol. 9, No. 2, 142-147 (1990))や、特願平5-142745号のようなヌクレオチドの検出方法への応用を示すことができる。これらのヌクレオチド配列の検出法においてはプローブのハイブリダイズ効率が検出感度を左右するので、本発明の促進法が感度の向上に貢献する。

【0019】この他にも、本発明の促進法は分析対象となる核酸配列に特異的な配列を持つ核酸のハイブリダイズによりその有無を確認する方法において利用できる。また、ポリメラーゼを利用した鋳型配列に基づく相補配列の合成においては、プライマーのハイブリダイズ工程に本発明の促進法を応用することができる。これら従来技術に本発明の促進法を応用することによって、プローブやプライマーのハイブリダイズを迅速に行うことができるようになる。また、本発明の促進法によれば、通常の条件ではハイブリダイズしにくい短い配列をハイブリダイズさせることが可能である。この特徴によって、例えば互いに相同性(ホモロジー)の高い核酸配列をわずかな配列の違いに基づいて識別することが可能となる。構成塩基数の多い長い配列では多少の塩基配列の違いにもかかわらず、完全に一致した場合と同じようにハイブリダイズしてしまう。ところが、本発明の促進法を応用すれば、短鎖長の第2プローブを利用することができるためわずかな配列の相違によってハイブリダイズしない

反応系を構成することができるのである。

【0020】このように本発明はヌクレオチド断片を小さくした時に避けられなかったハイブリダイゼーション効率の低下を効果的に抑制する技術を提供するものである。本発明の対象となる標的核酸は、その塩基配列が既知のポリヌクレオチドであり、動物、植物、細菌、酵母、糸状菌、マイコプラズマ、リケッチア、ウイルス他あらゆるものに由来する核酸を含む。また核酸としては、ゲノミック核酸はもちろん、RNAウイルスやmRNAから誘導されたcDNAを対象とすることも可能である。

【0021】本発明で第1、又は第2プローブとして採用する配列は、両者がギャップのない状態で隣接していること、そして少なくとも第1プローブは単独で標的核酸と安定な2本鎖を形成することを満足すればその他の制限はない。従って、例えば第1プローブと第2プローブが、必ずしも同時に標的核酸の配列に対して特異的である必要はない。両者が同時にハイブリダイズすることによって、配列に対する特異性が得られるので、いずれか一方が標的配列中に特異的に存在する領域と相補的であればよいのである。

【0022】本発明による検出法においては、第2プローブのハイブリダイズの有無を、第2プローブをプライマーとして利用しDNA合成の有無によって検出することが可能である。DNA合成は、合成産物を追跡する方法の他、合成時に生成するピロリン酸を追跡することでも検出できる。この場合は、試料中に存在するピロリン酸が結果を見誤らせる可能性があるので予め除去しておくのが好ましい。ピロリン酸の除去には、検出対象となる核酸を物理的に捕捉して分離してしまう方法や、ピロリン酸をピロフォスファターゼ等により予め酵素的に分解除去する方法などが利用できる。

【0023】従って、本発明においては増幅反応を行うためには可能な限り前記混入物を除去することが好ましい。例えば、固相に結合した捕捉プローブ等を用いて標的DNAを捕捉し、続いて洗浄により前記不純物を除去し、その後に本発明を適用するとバックグラウンドのない高感度の検出系が可能となる。このとき捕捉プローブを5'末端又は3'末端で固相と結合しておけば(Eur. J. Immunol., 23, 1895-1901(1993), H. Kohsaka et al.; Nucleic Acids Research, 21, 3569-3472 (1993), H. Kohsaka et al.)、捕捉プローブそのものを第1プローブとして本実験の方法を適用することも可能となる。

【0024】核酸合成酵素によりハイブリダイズした第2プローブをプライマー(複製開始点)とする延長反応(工程B')に基づいて標的核酸を検出する場合には、次のような条件とすることが好ましい。好ましい条件とは、第1プローブのみがハイブリダイズした場合には核酸合成酵素の基質となり得ないようにしておくことである。最も簡単な方法は、第1プローブの末端付近を意図

的に標的配列に対して相補性を持たせず、当該末端部分では2本鎖を形成しないようにしておくことである。

3'末端が2本鎖となっていなければ、核酸合成酵素は3'末端の水酸基(-OH基)にデオキシリボヌクレオチドリン酸を付加することができない。この原理を利用する場合は、第2プローブを第1プローブの5'側にハイブリダイズするよう設定する(即ち、第2プローブの3'末端と第1プローブの5'末端が隣接する)といふ。この時、第1プローブの第2プローブと隣接する側(5'末端)は2本鎖となるようにしておく必要がある。

【0025】これらの条件を総合すれば、本発明の核酸の検出法において利用しうる核酸合成反応の具体的な構成としては、 $\phi$ 29ポリメラーゼや、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片等の鎖置換型合成酵素による反応系が挙げられる。即ち、第1プローブの3'側を2本鎖とならないように鋳型と相補性を持たない配列としておく。一方、第1プローブの5'側は第2プローブのハイブリダイズを促進するために2本鎖を構成できる配列とする。これによって第1プローブが標的核酸にハイブリダイズした場合には第2プローブのハイブリダイズが促進され、続いてポリメラーゼにより第2プローブをプライマーとした核酸合成が開始される。このとき $\phi$ 29ポリメラーゼやクレノウ断片は2本鎖部分をはずしながら5'→3'方向に相補鎖を合成するので、第1プローブは酵素的に外されて行くことになる。

【0026】他方、第1プローブを核酸合成酵素の基質(プライマー)とならないようにする手段として、化学的に構造を変えてしまう方法を採用しても良い。即ち、核酸合成酵素がプライマーの3'末端の「-OH基」に対して次の塩基を結合していくことに着目し、この「-OH基」を除いた修飾第1プライマーを利用するのである。即ち、第1プローブの3'末端塩基の「-OH基」をジデオキシ化して「-H」とした塩基とすることである。ジデオキシ化第1プローブを利用すれば、第1プローブの3'側を鋳型核酸とは相補性を持たない配列にする必要はなく、第2プローブを第1プローブの5'側にハイブリダイズするよう設定する(即ち、第2プローブの3'末端と第1プローブの5'末端が隣接する)こともできるし、逆に第2プローブを第1プローブの3'側にハイブリダイズするよう設定する(即ち、第2プローブの5'末端と第1プローブの3'末端が隣接する)ことも可能である。第2プローブを第1プローブの5'側にハイブリダイズするよう設定する場合には、 $\phi$ 29ポリメラーゼや、大腸菌ポリメラーゼのクレノウ断片等の鎖置換型合成酵素が必要となるが、第2プローブを第1プローブの3'側にハイブリダイズするよう設定する場合には、鎖置換反応を行えない通常の核酸合成酵素も利用できるようになる。

【0027】第1プローブの3'末端を鋳型核酸と相補

性を持たないように設定する場合や、ジデオキシ化した第1プローブを用いる場合であっても、第2プローブの3'末端は鋳型核酸と水素結合していることが必要である。これによって始めて第2プローブの3'末端からのDNA合成が起こるようになる。即ち、第2プローブは第1プローブによるハイブリダイズの促進効果を受けるために第1プローブの末端に隣接していることと、DNA合成酵素により合成反応が起こるために3'末端が鋳型核酸と水素結合していることが要求される。

【0028】このようにして、第1プローブのみではプライマーとして機能することができず、第2プローブがハイブリダイズして始めて核酸合成酵素の基質とすることが可能な系を提供することができる。本発明のハイブリダイゼーションの促進法は、前記の標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせる工程において、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブとともにハイブリダイズさせることを特徴とするものである。

【0029】ここで、第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ、及び第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブは促進用プローブであり、「単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数」とは、通常10塩基以上、好ましくは10~100塩基、更に好ましくは15~30塩基である。

【0030】本発明において、「相補的」とは、塩基配列が塩基対のワトソン・クリック則に従って、もう一方の核酸と水素結合による二重鎖を形成し得る状態のことをいう。具体的には、アデニン(A)に対してはチミン(T)；グアニン(G)に対してはシトシン(C)が対応する相補性を有する状態である。もちろんRNAにおいては、Tに対してUが相補性を有する状態であることはいうまでもない。なお、本発明に用いるプローブは、標的となる核酸の塩基配列に対して完全に相補的である必要はなく、少なくとも当該プローブが全体として前記標的核酸に対してハイブリダイズすることが可能であれば足りる。具体的には、プローブの3'末端の塩基が標的核酸の塩基と100%対応することを必須として、プローブの塩基全体の最低70%が前記の相補性を標的核酸との関係において有することが必要である。かかる相補性が70%未満になると前記ハイブリダイズ自体が困難になるため好ましくない。但し、配列の選択にあたっては、第1プローブと第2プローブとが隣接する末端部分の塩基のみは完全に相補的になるように設定しなければなら



ない。末端が相補的でない時には、たとえ隣接する配列であっても本発明によるハイブリダイゼーションの促進効果は得にくくなる。更に、ヌクレアーゼによる分解工程を含む本発明による検出法においては、末端が2本鎖とならない時にはヌクレアーゼの分解作用が生じなくなってしまう。

【0031】本発明に用いる第1プローブ（促進用プローブ）及び第2プローブは、核酸合成機を用いて化学的に合成することができる。試薬としてヌクレアーゼを用いる場合は、促進用プローブは該ヌクレアーゼに対して耐性とする必要がある。一方、試薬としてヌクレアーゼを用いない場合は、促進用プローブは必ずしもヌクレアーゼ耐性とする必要はないが、試料中に共存する可能性のあるヌクレアーゼに対して耐性とするため、ヌクレアーゼ耐性とするのが好ましい。

【0032】促進用プローブをヌクレアーゼ耐性とする手段としては、当該プローブが3'又は5'側から分解されるのを防ぐため、ホスホロチオエート化等の修飾が有効である。更に、メチルホスホエート化、ホスホロジチオエート化等様々な修飾も可能である。用いる酵素は2本鎖を認識するものであるもので、5'又は3'側を標的核酸と非相補的な塩基配列とし、2本鎖を形成させなくすることによりヌクレアーゼ耐性とすることも可能である。5'又は3'側を固相に結合させることで、末端から分解反応を行うヌクレアーゼ耐性とすることも可能である。促進用プローブは繰り返しハイブリダイズ反応をさせる必要がないので標的核酸と安定なハイブリッドを形成するものが望ましい。

【0033】本発明によれば、第2プローブは、構成塩基数にかかわらずハイブリダイズが促進される。但し、本発明の促進法をヌクレアーゼによる検出技術に応用する場合には、第2プローブについてはわずかな分解で容易に標的核酸からはずれるようにするため、鎖長を短くすることが好ましい。即ち、第2プローブとしては鎖長が短いためTmが低く通常の温度では2本鎖が形成されないが、促進用プローブにより形成された2本鎖部分の存在により第2プローブがハイブリッドを形成できるようになること、更に核酸の検出法に用いる場合にはヌクレアーゼにて分解された後は速やかにハイブリッド形成能が消失し、新たな第2プローブ（検出用プローブ）と置き替わることが好ましい。そのためには塩基数が6～30であることが好ましく、6～20であることが更に好ましい。

【0034】用いる第2プローブ（検出用プローブ）は、λエクソヌクレアーゼを使用する場合は5'末端のリン酸化が必要であるが、酵素がエクソヌクレアーゼIIやリボヌクレアーゼHでは末端のリン酸化は不要である。本発明においては、プローブ核酸の使用量も反応の結果を左右する要素となる。促進用プローブは標的核酸に完全にハイブリダイズしていることが望ましいので、

標的核酸よりやや過剰量を用いる。一方、第2プローブはハイブリダイズ/分解/再ハイブリダイズのサイクル反応を起こさせるために、標的核酸に対してあまりにも少量のプローブ核酸しか存在しない時には十分な感度を得られなくなるおそれがある。標的核酸の量を予め予想することは困難であるが、少なくとも希望する検出範囲の標的核酸量に対して100倍以上の大過剰量で第2プローブ核酸を用いることが高い感度を確保するうえで重要な条件となる。

【0035】以下、ハイブリダイズの条件について述べる。

#### A) 塩濃度

塩濃度は通常0.1～1.2M（一般的には、Na<sup>+</sup>で0.2M程度）である。但し、酵素を用いるときはその至適条件に従う必要がある。以下に、本明細書中に例示した酵素のうち、代表的なものについて、それぞれがどのような条件を要求するのかを示す。これらの酵素を組合せるときには、十分な酵素活性を発揮できる条件を与えてやる必要がある。

#### <エクソヌクレアーゼIII>

至適pH：8付近

反応温度：37℃

安定化剤：SH試薬

その他：Mg<sup>2+</sup>が必要、70℃20分で失活する。

【0036】一般的な反応条件：50-60mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.66-5mM MgCl<sub>2</sub>, 1-10mM 2-メルカプトエタノール

保存溶液：10-25mM Tris-HCl(pH8.0), 50-100mM KCl, 0.5-1mM DTT, 50%グリセリン

#### <λエクソヌクレアーゼ>

至適pH：9付近

反応温度：37℃

安定化剤：SH試薬

その他：Mg<sup>2+</sup>が必要。

【0037】一般的な反応条件：67mMグリシン-KOH(pH 9.3), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>

保存溶液：10mM Tris-HCl(pH7.6), 10mM 2-メルカプトエタノール, 200μg/ml BSA, 50%グリセリン

#### <リボヌクレアーゼH>

至適pH：7～8付近

反応温度：37℃

安定化剤：SH試薬

その他：分子量2.1万、Mg<sup>2+</sup>又はMn<sup>2+</sup>により活性化される。

【0038】一般的な反応条件：40mM Tris-HCl(pH7.5), 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 4%グリセリン, 0.003% BSA

保存溶液：25mM Tris-HCl(pH7.5), 30mM NaCl, 0.5mM EDTA, 5mM 2-メルカプトエタノール, 50%グリセリン

#### <DNAポリメラーゼ Klenow fragment>

至適pH：7.5 付近

反応温度: 37℃

その他: 大腸菌のDNAポリメラーゼ I から 5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性を除いたもの

一般的な反応条件: 67mM リン酸カリウム (pH7.4), 6.7mM  $MgCl_2$ , 1mM 2-メルカプトエタノール

保存溶液: 50mM リン酸カリウム (pH6.5), 10mM 2-メルカプトエタノール, 50%グリセリン (又は50%エチレングリコール)

<逆転写酵素>

Rous associated virus (RAV-2) の起源のものについて (avian myeloblastosis virus 由来のものもほぼ同じ)

至適 pH: 8 付近

反応温度: 37℃

安定化剤: SH 試薬

その他: リン酸イオンは反応を阻害する。

【0039】一般的な反応条件: 50mM Tris-HCl (pH8.3), 5mM KCl, 10mM  $MgCl_2$ , 3mM DTT, 0.1% Nonident P-40

保存溶液: 200mM リン酸カリウム (pH7.2), 2mM DTT, 0.2% Nonident P-40, 50%グリセリン

B) 温度

反応温度は、 $T_m$  により設定する。第1プローブの  $T_m$  は高く設定し (酵素サイクル反応では外れない温度)、第2プローブは単独では酵素サイクル反応を起こさせる条件 (温度) ではハイブリダイズしにくく、第1プローブの促進作用によって始めてハイブリダイズできるような  $T_m$  を持つものが望ましい。なお、ハイブリダイズの至適温度は  $T_m$  より 5~15℃低いので、反応温度より 5~15℃高い  $T_m$  が望ましい。

【0040】この  $T_m$  を規定する要因としては、主にハイブリダイズする核酸の種類 (DNA か RNA か)、配列 (ホモロジー)、及び  $T_m$  に影響する共存物質の存在、の3点を挙げることができる。

B-1) 温度/核酸の種類の間から

DNA 同士のハイブリダイゼーションに対して、同じ配列であっても核酸の種類を変えると  $T_m$  も変化する。即ち、RNA-DNA ハイブリッドでは、10~15℃高くなり、RNA-RNA ハイブリッドでは、20~25℃高くなる。

B-2) 温度/プローブの配列の間から

一般には、標的核酸とプローブ塩基間のホモロジーが1%低下すると  $T_m$  が約1.5℃低下する、といわれている。従って、第1プローブ、第2プローブの標的配列に対するホモロジーにより温度条件を考慮する必要がある。逆に、温度によって特異性が制御されるといえる。即ち、 $T_m$  に近い温度を採用すれば特異性が高くなり、 $T_m$  から離れた温度を採用すれば多少の配列の違いにかかわらずハイブリダイズが進む。これを分析目的に合わせて採用するのが、現実的な方法である。

【0041】また、配列に含まれるGC対の数によっても

$T_m$  は変動する。GC対がAT対よりも強く結合するためである。14~20塩基であれば、GC対の数と  $T_m$  の間におよそ次のような関係が成り立つといわれている ("DNA PROBES" p.15-16; GEROGE H. KELLER, MARK M. MAMAT/Macmillan Publishers Ltd.)。

$T_m = 4^\circ C \times GC\text{対} + 2^\circ C \times AT\text{対}$

B-3) 温度/共存成分の間から

$T_m$  を低下させる物質として、ホルムアミドやジメチルスルホキシド (DMSO) が知られている。特にDMSOは蛋白に対する変性作用が低いので、酵素と組合せるときには好ましいといえる。これらの物質を共存させれば、 $T_m$  が下がり (即ちより低い温度で1本鎖⇌2本鎖状態の変化が起きようになる。本発明の検出法においては、結果的に、ハイブリダイズ→分解→ハイブリダイズ... サイクルを促進することになる。

【0042】具体的な数値としては、DMSOを1%添加すると  $T_m$  が約0.6℃下がるという報告がある (Analytical Biochemistry, 209, 284-290, 1993)。また、ホルムアミドと  $T_m$  の間には、プローブが20塩基程度ならば次のような関係が成り立つといわれている ("DNA PROBES" p.15-16; GEROGE H. KELLER, MARK M. MAMAT/Macmillan Publishers Ltd.)。

$T_m = [81.5^\circ C + 16.6 \log M + 0.41 (\% G + C) - 500] / n - 0.61 (\% \text{ホルムアミド})$

$M = [Na^+]$  in moles/liter

$n = \text{length in duplex}$

標的核酸が二本鎖状態である場合には、予め一本鎖に変性する必要がある。かかる変性方法としては、通常公知の変性方法、例えば加熱変性、酸変性、アルカリ変性等を挙げることができるが、方法の簡便性と確実性に鑑みれば、加熱変性 (90℃~100℃で5分以上加熱) を採用するのが好ましい。

【0043】本発明の標的核酸に対する相補鎖核酸のハイブリダイゼーションの促進法においては、前述したように、標的核酸に相補的な配列を持つ第2プローブをハイブリダイズさせる工程において、該第2プローブの3'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブ及び/又は該第2プローブの5'側に隣接する配列を持ち、かつ標的核酸と単独で安定な2本鎖を形成することが可能な塩基数を備えた第1プローブとともにハイブリダイズさせることにより、該第2プローブのハイブリダイゼーションの効率を促進することができる。この方法によれば、ハイブリダイズしにくい小さなサイズのオリゴヌクレオチドもハイブリダイズできるようになる。

【0044】本発明において、第1プローブは  $T_m$  が高く一旦ハイブリダイズした後は外れにくい (変性しにくい) し、また外す必要もない。このため、変性とハイブリダイズでは、第2プローブのときに比べ温度を高くす

る。その結果、ストリンジェンシー(Stringency)が強い、特異性の高いハイブリダイゼーションとなり有利である。

【0045】第1プローブと第2プローブを別々に加える方法は、分解酵素を用いた第2プローブの分解のサイクルを行うときに有利である。即ち、第1プローブを標的核酸にハイブリダイズさせておき、反応終了時までハイブリダイズした「安定な2本鎖」状態を維持させる必要があるが、その目的で、 $T_m$ を第2プローブより高く設定することが可能である。

【0046】また、第2プローブの $T_m$ を低くしてあるのは、酵素反応が可能な温度でハイブリダイズを起こしやすくさせるためであり、分解後は速やかに変性される(即ち外れる)。なお、「変性」は、2本鎖を1本鎖にする場合だけでなく、1本鎖の「もつれ」をほぐすことを目的として行うこともある(例えば実施例1)。長い核酸配列では、1本鎖であったとしても自己のG-C間で結合を持っており、そのままではプローブとのハイブリダイズに支障をきたす可能性がある。このG-C結合を解いてきれいな1本鎖とするためにも変性操作が要求される。

【0047】本発明の核酸の検出法は、以上のようにしてハイブリダイズさせた第2プローブ(検出用プローブ)を検出することにより、標的核酸の検出を可能にするものであり、遺伝子疾患や感染症の診断に有効である。本発明の核酸の検出法においては、検出を容易にするために予め検出用プローブを標識しておくことが好ましい。標識には、一般に核酸の標識技術として知られている方法を利用することができる。具体的には、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、ビオチン、酵素、ハプテン等を例示することができる。また、検出用プローブは必ずしも標識される必要はなく、例えばヌクレアーゼの作用で分解され反応系に蓄積する特定の鎖長の断片の増加を追跡すれば標的核酸の検出は可能である。これらの標識はプローブ核酸の任意の位置に導入することができる。

【0048】標識の検出にあたっては、ヌクレアーゼの作用を受けていない完全長のプローブ核酸に由来する標識の信号と、ハイブリダイズ~ヌクレアーゼによる分解を受けた産物に由来する標識の信号とを区別する必要がある。もっとも単純な方法は、両者を分子量の差に基づいて物理的に分離してしまう方法である。具体的には、液体クロマトグラフィーや電気泳動等の手法が応用できる。

【0049】ヌクレアーゼによって分解された第2プローブは、再び本発明のハイブリダイゼーション促進法を利用して分離することができる。即ち、図6に示すように第1プローブに1塩基を付加した配列(第1プローブ+1)を備えた捕捉用プローブを固相上に予め2本鎖として用意しておく。この2本鎖核酸は、ヌクレアーゼに

よって分解されて1塩基を失った第2プローブ(第2プローブ-1)に対して相補的な配列を1本鎖として備えたものとしておく。(2本鎖とした捕捉用プローブの末端より先に1本鎖部分が伸びた状態)。このような固相を第2プローブ-1と接触させれば、捕捉用プローブ

(2本鎖とした第1プローブ+1)によってハイブリダイゼーションが促進され固相上に捕捉される。こうして第2プローブ-1を、固相上に捕捉することが可能となる。なお、固相上で2本鎖を形成する第2プローブ-1に対して更にヌクレアーゼが作用するのを防ぐために、第2プローブの末端から1つ飛ばした部分の結合を少なくとも1つ、好ましくは複数の塩基間に渡ってヌクレアーゼ耐性としておく必要がある。あるいは、捕捉用プローブとの反応をヌクレアーゼの作用し得ない条件下で行ってもよい。

【0050】この他にもアガロースで標識しておきプローブ核酸がヌクレアーゼの作用で短くなったときにだけ立体障害が除去されて液相中のホロ酵素と複合化し酵素活性を発現するというCEDIA法(Clinica Chimica Acta, 185, 231-240 (1989))等の検出系の応用も可能である。標識の組み合わせとしては、発光-消光標識の組み合わせ、蛍光-偏光標識の組み合わせ等を例示することができる。このような標識の組み合わせを利用すれば、両者の物理的な距離の変化を信号の変化として追跡することができるので、均一系での分析が可能となる。

【0051】本発明の検出法に必要な各種成分は、予め組み合わせた試薬の形で供給することができる。本発明の核酸検出用試薬の構成を次に示す。以下に示す試薬には、更に標識の検出に必要な資材や反応液を構成する緩衝剤、あるいは陰性や陽性の対照等の任意の成分を組み合わせてキットの形とすることもできる。塩基配列検出用試薬の構成:

試薬キット(A)

- ・標的核酸に相補的な促進用プローブ
- ・検出用プローブ

試薬キット(B)

- ・標的核酸に相補的な促進用プローブ
  - ・検出用プローブ
  - ・ハイブリダイズした検出用プローブを特異的に認識し分解する酵素又はハイブリダイズした検出用プローブをプライマーとして伸長反応が可能な核酸合成酵素
- 前記試薬キット(B)を用いる場合、反応液に牛血清アルブミンやグリセリン又はエチレングリコール等を添加して、酵素を安定化することもできる。

【0052】本発明の検出法では、検出用プローブとしてハイブリダイズしにくい小さなサイズのオリゴヌクレオチドも利用することができる。検出用プローブのサイズが小さいことは溶液内での分子運動による標的核酸への移動に有利であり、ハイブリダイズに必要な時間が短縮できるのでプローブ法の迅速化に有用である。また、

プローブの調製が容易になるという利点もある。

【0053】また、本発明の検出法では、ハイブリダイズしたプローブのみに作用する酵素を用いてシグナル増幅ができるのでプローブ法を高感度にできる。更に、本発明の検出法は特別な温度制御操作をすることなく塩基配列の増幅と検出を行うことができるので自動化が容易である。また、生成物の増加が直線的に進むので標的核酸の定量性に優れる。

【0054】更に、反応で生成した産物によるコンタミネーションの影響を受け難いという利点もある。特にヌクレアーゼによって分解したプローブを検出する場合では、例え増幅後の核酸がコンタミネーションを起こしても増幅につながるおそれはない。以上のように本発明の検出法は種々の利点を有するものであり、遺伝子の分析において有効な方法となることが期待できる。

【0055】

【実施例】以下、調製例及び実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

(調製例1) プローブ核酸の調製

プローブ核酸として以下示す塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成して用いた。

(1) 標的核酸配列

モデル実験の材料として、HBVウイルス核酸のe抗原遺伝子の一部をM13mp18 DNA上にクローニングしたものを用いた。以下に示す配列を含む1本鎖環状DNAである(下段)。なお、()内に標的核酸と相補的なプローブ配列を示した。

【0056】

【化1】

```

+++++
|||||
(5' GGAGTGTGGATTGCGACTCCTCTGCTTACAGACCACCAATGCCCTATCTTATCAACACTTC3')
3' AAAACCTCACACCTAAGCGTGAGGAGGACGAATGTCTGGTGGTTACGGGATAGATAGTTGTGAAGGCT6'

```

!!! : 5' 側促進用プローブ

\*\*\* : 検出用プローブ (14mer)

+++ : 検出用プローブ (13mer)

... : 3' 側促進用プローブ

【0057】(2) 3' 側促進用プローブの塩基配列  
検出用プローブに隣接した領域を2本鎖とするため、検出用プローブの3'側の配列からなる25merを使用した。

5' AATGCCCTATCTTATCAACACTTC-OH

なお、エクソヌクレアーゼIIIに耐性とするため、3'末端のTCの間のホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合とした。

(3) 5' 側促進用プローブの塩基配列

検出用プローブに隣接した領域を2本鎖とするため検出用プローブの5'側の配列からなる25merを使用した。

5' GGAGTGTGGATTTCGCACTCCTCTCTG-OH

なお、エクソヌクレアーゼIIIに耐性とするため、3'末端のTGの間のホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合とした。

(4) Xプローブ

M13mp18のDNAシーケンス用プライマー(東洋紡製 M13 primer P7)を用いた(24mer)。この配列は検出用プローブから約670塩基離れた位置に存在する。

5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

(5) Yプローブ

無関係な配列で、M13mp18及びクローン化したHBV DNA上には相補性がない。HCV由来の配列。20mer。

5' TTCACGCGAGAAAGCGTCTAG

(6) 検出用プローブの塩基配列

検出用プローブとしてM13上にあるHBV由来の相補鎖DNA14塩基を用いた(14mer)。なお、13merは14merの3'末端の1塩基(A)を欠失したものである。

14mer : 5' CTTACAGACCACCA-OH

13mer : 5' CTTACAGACCACC-OH

前記のオリゴヌクレオチドは、β-シアノエチルアミダイト法(J. Am. Chem. Soc., 112, 1253-1254(1990))により合成した。合成機としてCyclone plus DNAsynthesizer (Milligen/Bioserch製、登録商標)を用いた。また、ホスホロチオエート結合は、S化試薬として、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド(Beaucage's reagent)を用いて導入した。合成したオリゴヌクレオチドは、常法に従いHPLC精製後、使用した。

【0058】検出用プローブは、γ-<sup>32</sup>P ATPとT4キナーゼを用いて5'末端を<sup>32</sup>P標識した。以下の実験では、この標識オリゴヌクレオチドを未標識オリゴヌクレオチドと混合して用いた。なお、検出はオートラジオグラムにより行うのでその都合上<sup>32</sup>P標識オリゴヌク

レオチド量は一反応当たり約 $1.0^4$  cpmになるように添加した。

【0059】(実施例1) ハイブリダイズの促進  
2つのオリゴヌクレオチドが隣り合わせてハイブリダイズしている場合には、それぞれが形成するハイブリッドは相互に安定化されて2本鎖が解離しにくくなる。この現象は隣合った領域が2本鎖を形成しているために、一旦形成されている2本鎖が変性しにくくなることを示したものであるが、本発明者らはこの変性する過程とは逆の2本鎖を形成する過程、即ちハイブリダイズする過程

・ 標的DNA	1 pmol
・ 5' 側及び/又は3' 側促進用プローブ	0.5 pmol
・ 検出用プローブ ( $^{32}$ P 標識 $10^4$ cpm)	0.01 pmol
・ 緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM $MgCl_2$ )	

↓

100 °C 5min, 65 °C 10min, 37°C 10min

↓

0.7%アガロースゲル電気泳動

(89mM Tris/Borate-2mM EDTA 緩衝液)

電気泳動後、オートラジオグラフィーによりハイブリダイズした核酸量を比較した。

【0061】結果を図1に示した。レーン1~7は検出用プローブに14merを用いたものである。レーン8~12は検出用プローブに13merを用いたものである。調製例1に示したように14merの検出用プローブの3'末端は、3'側促進用プローブの5'末端に隣接した配列からなる。また、13merの検出用プローブの3'末端と3'側促進用プローブの5'末端は接しておらず1塩基のギャップがその間に存在する。レーン1, 8はプローブのみの対照である。レーン2~7, 9~12は反応を行ったものを示した。5'側促進用プローブは検出用プローブの5'側に位置する25merを、3'側促進用プローブは検出用プローブの3'側に位置する25merを用いた。また、検出用プローブに対する相補性の位置から670塩基離れた位置にハイブリダイズし2本鎖を形成するXプローブ、及び標的核酸には相補性を持たないYプローブを対照に使用した。これらのプローブの詳細は調製例1に記載した。

レーン1: 検出用プローブ (14mer) のみ。

レーン2: 反応液から促進用プローブのみを除いたもの。

レーン3: 5'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン4: 3'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン5: 5'側及び3'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン6: Xプローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン7: Yプローブと検出用プローブを同時に加えた。

にも促進効果があるかどうかを調べた。

<加熱処理後、アニーリング操作を行った場合>ハイブリダイゼーション反応には、温度を上げて2本鎖を変性させる操作とそれに続いて温度を除々に下げてアニーリングさせる操作が必要である。そこで、標的DNA、検出するプローブに隣合った領域を2本鎖形成をさせるためのオリゴヌクレオチド (促進用プローブ)、及び検出用プローブの3種を同時に予め混合し、変性とアニーリング操作を行った。

【0060】反応条件を以下に示した。

・ 標的DNA	1 pmol
・ 5' 側及び/又は3' 側促進用プローブ	0.5 pmol
・ 検出用プローブ ( $^{32}$ P 標識 $10^4$ cpm)	0.01 pmol
・ 緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM $MgCl_2$ )	

↓

100 °C 5min, 65 °C 10min, 37°C 10min

↓

0.7%アガロースゲル電気泳動

(89mM Tris/Borate-2mM EDTA 緩衝液)

た。

レーン8: 検出用プローブ (13mer) のみ。

レーン9: 反応液から促進用プローブのみを除いたもの。

レーン10: 3'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン11: 5'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

レーン12: 5'側及び3'側促進用プローブと検出用プローブを同時に加えた。

【0062】検出用プローブは、単独では標的核酸には余りハイブリダイズできないが (レーン2)、5'側又は3'側促進用プローブが共存するとハイブリダイズの効率が上がることがわかった (レーン3, 4)。更に、5'側及び3'側促進用プローブが2種共存するとハイブリダイズの効率が非常に促進されることがわかった (レーン5)。

【0063】一方、検出用プローブがハイブリダイズする相補的な位置から670塩基離れているものを用いた場合にはその効果は認められなかった (レーン6)。また標的DNAとは相補性を持たないものでも促進の効果は見られなかった (レーン7)。検出用プローブが促進用プローブに隣接している場合は、検出用プローブのハイブリダイズは同様に促進されたが (レーン11)、検出用プローブが促進用プローブに隣接せず1塩基のギャップがある場合では、その効率は非常に悪くなることがわかった (レーン10)。

【0064】以上の結果から、短いオリゴヌクレオチドは2本鎖形成能 ( $T_m$ 値) が低いため通常のアニーリング温度ではハイブリダイズでき難いものでも、そのオリゴヌクレオチドに隣接する領域が2本鎖を形成している

場合にはハイブリダイズできるようになることがわかった。更に、検出用プローブが2個の促進用プローブの間に位置しかつそれぞれの促進用プローブに隣接する構造をもつ場合はハイブリダイズの効率が非常に促進されることがわかった。

【0065】即ち、検出用プローブが標的核酸に相補的な配列からなっており、かつ隣合った領域が2本鎖を形成させるような領域からなる促進用プローブが共存すると検出用プローブが標的核酸に効率よくハイブリダイズすることが明らかとなった。

【0066】(実施例2-a) 一定温度でハイブリダイズした場合の効果

実施例1に示したように、検出用プローブの隣合った領

- ・標的DNA 1 pmol
- ・5' 側及び/又は3' 側促進用プローブ 0.5 pmol
- ・緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>)

↓

100℃ 5min, 65℃ 10min, 37℃ 10min

(2) 検出用プローブの定温でのハイブリダイズ

- ・検出用プローブ (<sup>32</sup>P 標識 10<sup>4</sup> cpm) 0.01 pmol

↓ 37℃ 60min

0.7%アガロースゲル電気泳動

(89mM Tris/Borate-2mM EDTA 緩衝液)。

【0069】その結果、実施例1において図1に示したものと全く同じ実験結果を得ることができた。従って、検出用プローブと促進用プローブ及び標的核酸を同時に混合して加熱処理後、アニーリング操作を行った場合に限らず、予め促進用プローブを標的核酸にハイブリダイズさせて部分的な2本鎖を形成させておき、次いで一定温度で検出用プローブを添加した場合も標的核酸に効率よくハイブリダイズすることがわかった。

- ・標的DNA 0.1 pmol
- ・5' 側及び/又は3' 側促進用プローブ 0.5 pmol
- ・緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>)

↓

100℃ 5min, 65℃ 10min, 37℃ 10min

(2) 検出用プローブの定温でのハイブリダイズ

- ・検出用プローブ (<sup>32</sup>P 標識 10<sup>4</sup> cpm) 10 pmol

↓ 37℃ 60min

0.7%アガロースゲル電気泳動

(89mM Tris/Borate-2mM EDTA 緩衝液)。

【0072】電気泳動後、オートラジオグラフィーによりハイブリダイズしたプローブ核酸量を比較した。結果を図2(1)に示した。

レーン1: 3' 側促進用プローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブを加えた。

レーン2: Xプローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブを加えた。

レーン3: Yプローブを加えて反応(1)を行った後、検出用プローブを加えた。

域が2本鎖を形成している場合には、検出用プローブが標的核酸に効率よくハイブリダイズすることがわかった。これは検出用プローブと促進用プローブ及び標的核酸を同時に混合して加熱処理後、アニーリング操作を行った場合である。

【0067】そこで、予め促進用プローブを標的核酸にハイブリダイズさせて部分的な2本鎖を形成させておき、次いで一定温度で検出用プローブを添加した場合についての効果を調べた。反応条件を以下に示した。

(1) 検出用プローブの5' 側又は3' 側の領域に促進用プローブを用いて2本鎖を形成させる。

【0068】

【0070】(実施例2-b) 実施例2-aは促進用プローブ及び検出用プローブのモル比を実施例1と同様にして行ったものである。次に、標的DNAに対しプローブDNAを過剰量添加した場合について調べた。反応条件を以下に示した。

【0071】(1) 検出用プローブの5' 側又は3' 側の領域に促進用プローブを用いて2本鎖を形成させる。

レーン4: 促進用プローブを加えずに反応(1)を行った後、検出用プローブを加えた。

レーン5: 検出用プローブのみの対照である。

【0073】検出用プローブは37℃の一定温度では標的核酸には殆どハイブリダイズしなかったが(レーン4)、促進用プローブによって隣接した領域が2本鎖を形成している場合にはハイブリダイズの効率が上がることがわかった(レーン1)。促進用プローブで形成された2本鎖部分が670塩基離れている場合にはその効果



は認められなかった(レーン2)。更に、標的DNAと相補性を持たないものを促進用プローブとしても促進効果がないことがわかった(レーン3)。

【0074】(実施例2-c)実施例2-bの結果を確認するため、検出用プローブに13mer(レーン1~3)又は14mer(レーン4~6)を用いて実験を行った。反応条件は実施例2-bと同様である。結果を図2(2)に示した。

レーン1: 検出用プローブ(13mer)のみを加えた。

レーン2: 3'側促進用プローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブ(13mer)を加えた。

レーン3: 5'側促進用プローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブ(13mer)を加えた。

レーン4: 検出用プローブ(14mer)のみを加えた。

レーン5: 3'側促進用プローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブ(14mer)を加えた。

レーン6: 5'側促進用プローブを加えて反応(1)を行い2本鎖を形成後、検出用プローブ(14mer)を加えた。

【0075】37℃の一定温度では検出用プローブは殆どハイブリダイズしなかった(レーン4)。検出用プローブの3'側又は5'側に隣接した領域を前もって促進用プローブを用いてハイブリダイズさせて既に2本鎖を形成させてある場合には、検出用プローブのハイブリダイズが促進されることがわかった(レーン5及び6)。

【0076】一方、13merの検出用プローブを用いた場合では、3'側促進用プローブではハイブリダイズが促進されなかった(レーン2)のに対し、5'側を促進用プローブとした場合には検出用プローブがハイブリダイズした(レーン3)。以上の結果より、検出用プローブを促進用プローブと同時に混合して加熱処理後、標的核酸とアニーリング操作を行った場合のみならず、予め促進用プローブを標的核酸にハイブリダイズさせて部分的な2本鎖を形成させておき、次いで一定温度で検出用プローブを添加した場合にも同様のプローブのハイブリダイゼーションの促進効果が認められた。また、ハイブリダイズの効率を上げる促進用プローブは、検出用プローブの末端とギャップのない隣合った配列であることが必要であることが確認できた。

【0077】(実施例3) CSHを利用したシグナル増幅法

実施例2に示したように促進用プローブで予め2本鎖を形成させておけば、一定温度でも検出用プローブのハイブリダイズを促進できることがわかった。このことから一定の通常温度での酵素反応が可能と考えられる。そこ

で、この現象を基に1本鎖DNAには作用せずハイブリダイズしたプローブ核酸のみを切断し、かつ塩基配列によって限定されないヌクレアーゼ活性を利用したシグナル増幅法を開発した。

【0078】CSHとエクソヌクレアーゼIIIを利用したシグナル増幅法の反応原理を図3に示す。

(1) 標的核酸に相補性をもつ促進用プローブ(第1プローブ)をハイブリダイズさせ、部分的な2本鎖領域を形成させる。即ち、促進用プローブ(第1プローブ)を標的核酸を含む検体と混合し、高温にて変性後、アニーリング操作を行って2本鎖を形成させる。なお、促進用プローブ(第1プローブ)はエクソヌクレアーゼIII(ExoIII)に耐性とするため、3'末端をホスホロチオエート結合とした。

(2) 前記(1)で形成された2本鎖領域の5'側に近接した領域に相補性をもつ検出用プローブ(第2プローブ)を添加する。検出用プローブ(第2プローブ)の3'末端と促進用プローブ(第1プローブ)の5'末端がギャップのない隣合った配列とする。また、検出用プローブ(第2プローブ)は以下の反応で消費されるので、添加量は標的核酸の大過剰とする。

【0079】用いる検出用プローブ(第2プローブ)は鎖長を調節することにより単独ではハイブリダイズしにくいものが望ましい。即ち、検出用プローブはその鎖長を短く(20塩基長以内)することにより通常の反応温度(30~55℃)においてはハイブリダイズしにくい、促進用プローブ(第1プローブ)によって形成された2本鎖領域がある場合にはハイブリダイズ形成が促進されるものとしておく。

(3) この条件下でエクソヌクレアーゼIII(ExoIII)を添加し、30~55℃の一定温度で分解反応を開始させる。

【0080】エクソヌクレアーゼIIIによる分解は3'→5'方向へ進むので、検出用プローブの5'側に2本鎖領域がある場合は、分解はプローブの外側から起こるのに対し、検出用プローブの3'側に2本鎖領域がある場合は、分解はプローブの内側から分解が起こることになる。即ち、前者の場合は2本鎖領域と検出用プローブが近接したままであるのに対し、後者では分解に伴って両プローブの間隔が離れることになるので速やかにCSHによる安定化の効果が失われ、分解されたプローブが離脱する。

【0081】なお、用いたエクソヌクレアーゼIIIは耐熱性ではないので30~55℃で行う。エクソヌクレアーゼIIIは核酸の2本鎖部分の3'末端からしか作用できないので、標的核酸やハイブリダイズしていない遊離のプローブ核酸はヌクレアーゼによる分解を受けない。なお、図3及び本実施例では促進用プローブはこのヌクレアーゼにて分解されることを防ぐためホスホロチオエート化の修飾を行った。

(4) ヌクレアーゼによる検出用プローブの分解でC S Hの効果が消失し、もはや2本鎖構造を維持できなくなって標的核酸よりプローブが外れる。この結果、標的核酸はもとの1本鎖にもどる。この結合部位に未反応の検出用プローブ(第2プローブ)がハイブリダイズする。他方、ヌクレアーゼの作用で断片化されたプローブ核酸が反応液中に遊離し蓄積される。

・標的1本鎖核酸 0.1 pmol  
 ・3' 側促進用プローブ 0.5 pmol  
 ・緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM MgCl<sub>2</sub>)

↓  
 100°C 5min, 65 °C 10min, 37°C 10min

↓  
 ・検出用プローブ (<sup>32</sup>P 標識 10<sup>4</sup> cpm) 10 pmol  
 ・エクソヌクレアーゼIII 1 unit

↓ 37°C 60 分  
 19%アクリルアミドゲル電気泳動  
 (89mM Tris/Borate-2mM EDTA/ 8M urea 緩衝液)

↓  
 オートラジオグラフィーによりプローブの分解産物を検出した。

【0083】結果を図4(a)に示した。

レーン1: 標的DNAのみを添加せず反応させた。  
 レーン2: 標的DNA、促進用プローブ及び検出用プローブ全てを加えて反応させた。  
 レーン3: 促進用プローブのみを添加せず反応させた。

【0084】標的DNA、促進用プローブ及び検出用プローブ全てを加えて反応させた場合には分解産物が蓄積するのに対し(レーン2)、促進用プローブを除いたものでは分解産物の蓄積する効率は低かった(レーン3)ことから、図3に示した模式図のサイクル反応が起こることが確認できた。また、標的DNAがない場合では殆ど検出用プローブは分解されないことから(レーン1)、標的DNAの存在に依存した反応であることが確認できた。

【0085】次いで、鋳型核酸の特異性を調べた。即ち、標的核酸としてプローブが相補性を持たない配列からなるものを用い、反応の特異性を調べた。反応条件は、図4(a)の場合と同様である。結果を図4(b)に示した。

レーン1: 促進用プローブ及び検出用プローブに相補性をもつ配列を含む標的核酸(HBVの配列を持つM13mp18)を用いて反応させた。  
 レーン2: 促進用プローブ及び検出用プローブに相補性をもたない核酸配列(M13mp18)を用いて反応させた。

レーン3: 鋳型を添加せず反応させた。

【0086】検出用プローブの分解は促進用及び検出用プローブと相補性を持つ鋳型を用いたときにのみ起こること(レーン1)から、この反応は配列に特異的なものであることが確認できた。標的核酸量を変化させ、検出

(5) 前記(2)~(4)の反応が継続して起こり、検出用プローブ(第2プローブ)の分解物が蓄積する。この分解物の産生量を測定することにより標的核酸量を推定する。

【0082】次に、以上の原理が実際に進行するかどうかを検討した。反応条件を以下に示した。

感度について検討した結果を図5に示した。反応条件は図4(b)の場合と同様であるが、鋳型核酸の濃度を、1 pmolから1 fmolまで変化させた。

レーン1: 鋳型核酸を1 pmol 用いた。  
 レーン2: 鋳型核酸を0.1 pmol 用いた。  
 レーン3: 鋳型核酸を10 fmol 用いた。  
 レーン4: 鋳型核酸を1 fmol 用いた。  
 レーン5: 鋳型核酸を添加しない(対照)。

【0087】この条件下では、鋳型核酸が10 fmol以上あれば検出できることが分かった(レーン3)。鋳型当たりの検出用プローブの分解のターンオーバー数を計算するため、各バンドを切り出し液体シンチレーションカウンタによりそれぞれカウントを測定したところ、検出用プローブの分解は促進用プローブがあると約10倍に促進されていることが分かった。

【0088】(実施例4) λエクソヌクレアーゼによる分解

実施例3から明らかなように、3'末端が促進用プローブの5'側と隣接した検出用プローブを用い、プローブを分解する酵素としてエクソヌクレアーゼIIIを用いることにより標的DNAに特異的なプローブの分解によるシグナル増幅が可能である。

【0089】実施例3で述べたのと同様に、エクソヌクレアーゼIIIの代わりに2本鎖DNAを特異的に分解する酵素としてλエクソヌクレアーゼを利用することができる。即ち、標的核酸及び検出用プローブがDNAである場合、2本鎖核酸に特異的でDNAの5'末端から分解するλエクソヌクレアーゼを利用できる。検出用プローブは5'末端が促進用プローブの3'側と隣接したものをを用いる。またλエクソヌクレアーゼはDNAの5'

末端がリン酸化されているものに作用するので、検出用プローブの5'末端は前もってリン酸化しておく。このため、促進用プローブをヌクレアーゼに耐性にするには5'末端を非リン酸化とするだけでもよい。

【0090】反応条件としては、67mMグリシン-KOH (pH9.3)、2.5mM塩化マグネシウムを基本的な緩衝液として用い、その他の条件は実施例3と同様とすることができる。

(実施例5) リボヌクレアーゼHによる分解

プローブを分解する酵素としてリボヌクレアーゼHを用いることもできる。即ち、標的核酸がDNAであり、検出用プローブがRNA又はRNAを一部に含むものであり、酵素がDNA-RNAハイブリッドのRNA部分を特異的に分解するリボヌクレアーゼHである場合にも応用できる。リボヌクレアーゼHはRNAの途中をエンドヌクレアテックに分解するので、検出用プローブの位置は促進用プローブに隣接しておればよく、5'又は3'側どちらの位置でもよい。また促進用プローブを検出用プローブに隣接した5'及び3'両側としてもよい。促進用プローブをリボヌクレアーゼH耐性とするには、リボヌクレアーゼHはDNAを分解できないのでDNAとするだけでもよい。

【0091】一般にRNAは不安定であり、またコンタミネーションしているリボヌクレアーゼにより容易に分解される。このため、検出用プローブをDNA-RNA-DNAの複合体にするとよい。反応条件としては、40mM Tris-HCl (pH7.7)、4mM塩化マグネシウム、1mMジチオスレイトール、4%グリセリン、0.03%ウシ血清アルブミンを基本的な緩衝液として用い、その他の条件は実施例3と同様とすることができる。

【0092】(実施例6) CSHを利用したプライマー伸長法

(DNAポリメラーゼによる合成) CSHによるハイブリダイゼーションの促進を利用すれば、通常ではサイズが小さいためハイブリダイズできずDNA合成のプライマーとなれないものでも鋳型核酸と2本鎖を形成できるのでプライマーとなりうる。従って、これを利用し標的核酸をDNAとした以下の反応を行うことができる。例えば、実施例3~5で生じた短くなって、もはやハイブリダイズできないものでも検出することができるようになる。

【0093】なお、検出用プローブのハイブリダイゼーションは繰り返し起こる必要がないので、検出用プローブは予め標的DNAや促進用プローブと混合後、加熱処理し、次いで温度を下げてアニーリングした後にポリメラーゼを添加することもできる。促進用プローブはDNA合成酵素に付随しているヌクレアーゼに耐性であることが望ましいので、促進用プローブの3'又は5'側を修飾しておくといよい。また、促進用プローブからDNA合成が起こらない方が望ましいので、促進用プローブの

3'末端をジデオキシ化又は鋳型とは相補性のない塩基とすることにより促進用プローブからの合成が起こらないようにする。また、DNA合成酵素はKlenow(Exo-)やφ29由来の鎖置換型のものを用いることにより、促進用プローブがプライマーとなる検出用プローブの3'側(DNA合成の下流)であっても合成反応が継続できるようになる。

【0094】(逆転写酵素による合成) 標的核酸がRNAである場合は逆転写酵素を用いることができる。即ち、前述したDNAポリメラーゼによる合成と同様にCSHによるハイブリダイゼーションの促進を利用すれば、通常ではサイズが小さいためハイブリダイズできずDNA合成のプライマーとなれないものでもプライマーとなりうる。従って、これを利用し標的核酸をRNAとした反応を行うことができる。なお、検出用プローブのハイブリダイゼーションは繰り返し起こる必要がないので、検出用プローブは予め標的DNAや促進用プローブと混合した後、加熱処理し、温度を下げてアニーリングした後、逆転写酵素を添加することもできる。

【0095】促進用プローブは逆転写酵素に付随しているヌクレアーゼに耐性であることが望ましいので、促進用プローブの3'及び5'側を修飾しておくといよい。また、促進用プローブからDNA合成が起こらない方が望ましいので、促進用プローブの3'末端をジデオキシ化又は鋳型とは相補性のない塩基とすることにより促進用プローブからの合成が起こらないようにする。逆転写酵素は、Rous associated virus 2(RAV-2)由来の酵素をはじめ各種の市販の酵素を用いることができる。

【0096】

【発明の効果】本発明のハイブリダイゼーションの促進法によれば、ハイブリダイズしにくい小さなサイズのオリゴヌクレオチドもハイブリダイズすることができる。本発明の核酸の検出法によれば、プローブ法の迅速化、高感度化が可能になり、またコンタミネーションの影響を受けにくくなる。

【0097】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATGCCCTA TCTATCAAC ACTTC 25

【0098】配列番号：2

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

GGAGTGTGGA TTCGCACTCC TCCTG 25

【0099】配列番号: 3

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列

CGCCAGGGTT TTCACAGTCA CGAC 24

【0100】配列番号: 4

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列

TTCACGCAGA AAGCGTCTAG 20

【0101】配列番号: 5

配列の長さ: 14

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列

CTTACAGACC ACCA

14

【0102】配列番号: 6

配列の長さ: 13

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

## 配列

CTTACAGACC ACC

13

【図面の簡単な説明】

【図1】促進用プローブを検出用プローブ及び標的DNAと共に混合し、加熱処理後、アニーリングさせた場合のハイブリダイズに対する促進効果を示す図である。

【図2】促進用プローブを標的DNAと混合して加熱処理後、アニーリングさせた後、一定温度で検出用プローブを添加した場合のハイブリダイズに対する促進効果を示す図である。

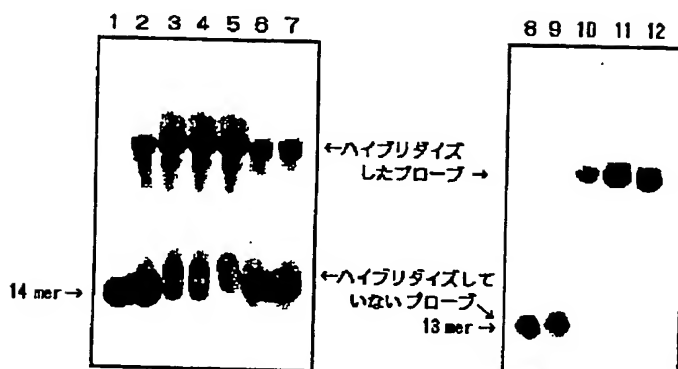
【図3】CSHを利用したエクソヌクレアーゼIII (Exo III) によるシグナル増幅の模式図である。

【図4】CSH/エクソヌクレアーゼIII によるシグナル増幅への促進用プローブの効果と、鋳型特異性を示す図である。

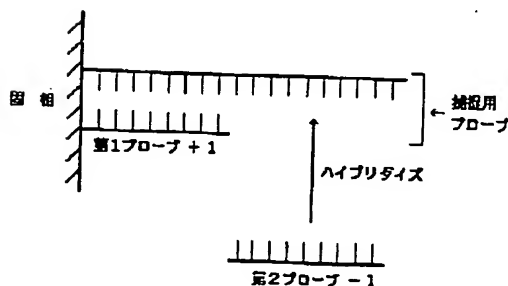
【図5】CSH/エクソヌクレアーゼIII によるシグナル増幅の感度を示す図である。

【図6】捕捉用プローブを示す図である。

【図1】



【図6】



【図2】

